

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Caroline Rossi Canani

**ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Enterococcus faecalis* ISOLADOS
DE AMOSTRAS DE URINA**

Porto Alegre

2017

Caroline Rossi Canani

**ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Enterococcus faecalis* ISOLADOS
DE AMOSTRAS DE URINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharela em Biomedicina.
(Habilitação em Biologia Molecular)

Orientadora: Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon
Co-orientadora: Ms. Renata Oliveira Soares
Colaboradoras: Letícia da Fontoura Xavier Costa e
Tiela Trapp Grassotti

Porto Alegre

2017

Caroline Rossi Canani

**ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Enterococcus faecalis* ISOLADOS
DE AMOSTRAS DE URINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 20 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Michelle Bertoni Mann – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Juliana Caierão – Hospital Moinhos de Vento

Profa Dra. Ana Paula Guedes Frazzon – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por toda força, companheirismo e amor incondicional. Obrigada por toda dedicação aos meus estudos e por compreender minha ausência em diversos momentos. Essa conquista é um mérito nosso, sem vocês não teria chegado até aqui! Amo vocês!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, por possibilitarem a realização desse trabalho.

À toda equipe do Laboratório 222C do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, pela colaboração e, principalmente, pela amizade. Obrigada por todos os momentos incríveis de ensinamentos e de descontração.

À minha orientadora Professora Doutora Ana Paula Guedes Frazzon, pelo enorme apoio, conhecimento transmitido e por me orientar de forma exemplar. Muito obrigada por me acolher e pela oportunidade incrível que foi tê-la como orientadora.

À minha co-orientadora Ms. Renata Oliveira Soares por me guiar em inúmeros momentos difíceis e por toda a experiência enriquecedora na microbiologia. Sobretudo, muito obrigada por se tornar uma verdadeira amiga!

Agradeço às mestrandas Letícia Xavier e Tiela Grassotti, por me auxiliarem na realização desse trabalho, pela amizade, companheirismo e por inúmeros momentos divertidos.

Ao meu namorado, Eduardo Sperotto, por estar ao meu lado desde o início da minha jornada no curso de Biomedicina. Obrigada pelo apoio e o incentivo, por acreditar em mim sempre.

A todos os meus amigos e familiares que me acompanharam e que, de alguma forma, ajudaram-me a tornar esse trabalho possível. Muito obrigada!

RESUMO

O gênero *Enterococcus* sp. é reconhecido por pertencer à microbiota intestinal normal de seres humanos, estabelecendo uma relação comensal estável na maior parte dos casos. Entretanto, essa relação equilibrada pode ser alterada, substituindo o papel benéfico desses micro-organismos para patógenos oportunistas. Dessa forma, os enterococos estão fortemente associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando graves problemas em pacientes imunossuprimidos, hospitalizados, com dispositivos médicos invasivos ou sob terapia com múltiplos antimicrobianos. Dentro do gênero, *Enterococcus faecalis* é considerado uma das principais causas de IRAS, sendo principalmente associado às infecções do trato urinário. Tais infecções tornam-se clinicamente importantes, uma vez que os isolados frequentemente possuem múltiplos genes de resistência a antimicrobianos, o que diminui as opções terapêuticas disponíveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e detectar genes de resistência em *E. faecalis* isolados de amostras de urina de pacientes de um hospital geral de Porto Alegre. Um total de 51 cepas de *E. faecalis* foram selecionadas e submetidas à técnica de disco-difusão frente a treze antimicrobianos e a testes de concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos foram avaliados conforme as normativas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2016). A presença dos genes de resistência à tetraciclina (*tet(M)*, *tet(L)*, *tet(S)*), eritromicina (*ermB*, *msrC*) e aos aminoglicosídeos (*aac(6')*-*Ie-aph(2'')*-*Ia*) foi detectada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As bactérias selecionadas apresentaram perfil de resistência aos aminoglicosídeos, anfencóis, β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclinas, macrolídeos e às oxazolidinonas pelo teste de disco-difusão, mostrando um perfil de múltipla resistência em 58,8% das cepas. Em relação aos genes de resistência, 64,7% dos isolados apresentaram resultados positivos para a PCR para pelo menos um dos genes testados. Os resultados demonstram que as cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras de urina de pacientes apresentavam resistência aos antimicrobianos comumente empregados na clínica médica, o que pode interferir diretamente na escolha da terapia para essas infecções.

Palavras-Chave: enterococos; resistência; antimicrobianos; gene de resistência; infecções do trato urinário;

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* sp. is recognized as belonging to the normal intestinal microbiota of humans, with a stable commensal relationship in most cases. However, this balanced relationship can be altered by replacing the beneficial role of these microorganisms for opportunistic pathogens. Thus, enterococci are strongly associated with healthcare associated infections (HAI), causing severe problems in immunosuppressed patients, hospitalized patients, patients with invasive medical devices or under therapy with multiple antimicrobials. Within the genus, *Enterococcus faecalis* is considered one of the main causes of HAI, being mainly associated urinary tract infections. Such infections become clinically important as isolates often have multiple antimicrobial resistance genes, which decreases the available treatment options progressively. The present study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile and to detect resistance genes in *E. faecalis* isolated from urine samples from patients of a general hospital in Porto Alegre. A total of 51 strains of *E. faecalis* were selected and submitted to the disc-diffusion technique against thirteen antimicrobials and minimum inhibitory concentration (MIC) tests. The results were evaluated according to the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute (2016). The presence of tetracycline (*tet(M)*, *tet(L)*, *tet(S)*), erythromycin (*ermB*, *msrC*) and the aminoglycosides (*aac-(6')-Ie-aph(2'')* - 1a) resistance genes was detected by the reaction in polymerase chain reaction (PCR). The selected bacteria showed a resistance profile to aminoglycosides, phenicols, β -lactams, quinolones, tetracyclines, macrolides and oxazolidinones by the disc diffusion test, showing a multiple resistance profile in 58.8% of the strains. Regarding the resistance genes, 64.7% of the isolates presented PCR positive results for at least one of the genes tested. The results demonstrate that strains of *E. faecalis* isolated from urine samples from patients showed resistance to antimicrobials commonly used in the medical clinic, which may directly interfere with the therapy of choice for these infections.

Key Words: enterococci; resistance; antimicrobials; resistance gene; urinary tract infections.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC = *American Type Culture Collection*

BHI = Caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*)

CIM = Concentração Inibitória Mínima

DP = Desvio padrão

DNA = Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

ERV = Enterococo resistente à vancomicina

IRAS = Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ITUs = Infecções do trato urinário

MH = Mueller-Hinton

NaCl = Cloreto de sódio

RNA = Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

rRNA = Ácido ribonucleico ribossomal

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH = Potencial hidrogeniônico

UFCSA = Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Principais formas de transmissão de enterococos no ambiente hospitalar, demonstrando a forma de disseminação de infecções relacionadas à assistência à saúde (imagem adaptada de Arias & Murray, 2012). 12
- Figura 2:** Possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos encontrados em bactérias do gênero *Enterococcus* sp. (Figura adaptada de Arias & Murray, 2012). 18
- Figura 1 (Artigo Científico):** Representação gráfica do perfil de resistência de cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras de urina em relação aos pacientes do sexo feminino e masculino. 43
- Figura 2 (Artigo Científico):** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação gerados pela técnica de PCR convencional para os genes de resistência encontrados nas cepas desse estudo. Na canaleta 1: marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb; canaletas de 2-6: Fragmentos de DNA com peso molecular esperado para os genes *tet(S)*, *ermB*, *aac(6')/aph(2'')*, *tet(M)* e *tet(L)*, respectivamente. 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 (Artigo Científico):** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de PCR para a identificação da espécie e detecção de genes de resistência a antimicrobianos.42
- Tabela 2 (Artigo Científico):** Perfil genético dos genes de resistência das cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras de urina. 42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1.	O gênero <i>Enterococcus</i> sp.	10
1.2.	Resistência a antimicrobianos.....	13
1.3.	Infecções do trato urinário e <i>Enterococcus</i> sp.	18
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1.	Objetivo Geral.....	22
3.2.	Objetivos Específicos	22
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
	RESUMO.....	24
	INTRODUÇÃO	25
	MATERIAIS E MÉTODOS	26
	Isolados bacterianos	26
	Extração de DNA bacteriano.....	27
	Confirmação genotípica da espécie <i>Enterococcus faecalis</i> por PCR.....	27
	Testes de suscetibilidade a antimicrobianos.....	28
	Determinação da concentração inibitória mínima para cepas resistentes à gentamicina e à estreptomicina	29
	Detecção dos genes de resistência.....	30
	Análise Estatística	30
	RESULTADOS	30
	Isolados clínicos de urina e confirmação da espécie.....	30
	Suscetibilidade aos antimicrobianos	31
	Avaliação do perfil genético	32
	DISCUSSÃO	33
	CONFLITO DE INTERESSES	36
	SUPORTE FINANCEIRO	36
	REFERÊNCIAS.....	36
	ANEXO - TABELAS E FIGURAS.....	42
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Enterococcus* sp.

Os enterococos foram primeiramente conhecidos em 1899 por Thiercelin, que destacou em seu estudo bactérias Gram-positivas de origem intestinal, capazes de causar infecções em humanos (Thiercelin & Jouhaud, 1899). Inicialmente, devido às semelhanças, os enterococos foram agrupados com o gênero *Streptococcus*, pertencendo ao grupo sorológico D de Lancefield, sendo diferenciados em um subgrupo devido a uma série de características bioquímicas distintas (Sherman, 1937). Em 1984, através de técnicas de hibridização de DNA-DNA e o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA), Schleifer e Kilpper-Balz determinaram que as espécies *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* eram distantemente relacionadas ao restante do gênero *Streptococcus*, propondo a reclassificação em um novo gênero, denominado *Enterococcus* sp. (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984). Atualmente, mais de 50 espécies foram classificadas nesse gênero, com base em evidências filogenéticas, sequenciamento do gene 16S rRNA e estudos de hibridização DNA-DNA (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Parte, 2014).

O gênero *Enterococcus* sp. compreende bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, oxidase e catalase negativas, que são pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas (LAB). Possuem microscopicamente formato celular ovoide e podem se apresentar em cadeias curtas, pares ou em células únicas (Murray *et al.*, 1990; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Os enterococos também resistem particularmente a uma ampla faixa de condições e, por isso, crescem em temperaturas que variam entre 10°C e 45°C, tendo um crescimento ótimo em 35°C, podendo ainda tolerar por 30 minutos a uma temperatura de 60°C (Lebreton *et al.* 2014; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Tipicamente, podem se desenvolver em meio de cultivo contendo 6,5% de cloreto de sódio (NaCl) e hidrolisar L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e esculina na presença de 40% de sais biliares (Lebreton *et al.* 2014). Além disso, crescem em uma ampla variedade de pH (entre 4,6 e 9,9), sendo seu crescimento ótimo em 7,5 (Fisher & Phillips, 2009). O isolamento desses micro-organismos pode ser realizado a partir do cultivo em ágar Mueller-Hinton (MH), *Brain Heart Infusion* (BHI) ou em meios enriquecidos como o ágar azida ou ágar sangue, apresentando-se nesse último como gama-hemolítico na maior parte dos casos (ANVISA, 2014).

A distribuição dos enterococos pela natureza é variada, estando presentes principalmente na microbiota de humanos e animais vertebrados e invertebrados. Por serem capazes de sobreviver em diversas condições, podem ser isolados a partir do solo, da água e de uma variedade de alimentos, especialmente os de origem animal (Fisher & Phillips, 2009; Klein, 2003). Como os enterococos possuem um habitat preferencialmente intestinal, esses micro-organismos são também utilizados como indicadores de contaminação fecal em alimentos e na água, auxiliando na avaliação das condições sanitárias dessas fontes (Werner, 2013).

Em humanos, os enterococos são bactérias comensais que habitam principalmente o trato intestinal, ainda que em minoria (em torno de 10^5 a 10^8 UFC por grama de fezes), sendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* as mais frequentemente encontradas (Tannock & Cook, 2002; Klein, 2003). Além disso, os enterococos são ocasionalmente encontrados na cavidade oral, canal vaginal e na superfície da pele. Por pertencerem à microbiota normal, são capazes de coexistir com o hospedeiro mesmo na presença dos sistemas de defesa dos ambientes onde estão presentes (Patel, 2004; Jett *et al.*, 1994; Van Tyne & Lebreton *et al.*, 2014). Por essa razão, são utilizados muitas vezes como probióticos de forma segura. Entretanto, em certas situações, essa relação estável de comensalismo pode ser interrompida, alterando o papel desses micro-organismos para patógenos oportunistas capazes de causar infecções mais sérias, as quais podem ser adquiridas também da própria microbiota do paciente (Tannock & Cook, 2002; Koch *et al.*, 2004).

Tal desequilíbrio pode ser originado pela imunossupressão, a qual aumenta a patogenicidade desses micro-organismos, e pelo uso de múltiplos antimicrobianos, que favorece a disseminação de genes de resistência entre os enterococos e aumenta a pressão seletiva (Arias & Murray, 2012; Garsin *et al.*, 2014). Além disso, alguns fatores que contribuem para a permanência dessas bactérias como patógenos oportunistas incluem o avanço da medicina atual, que tornou mais frequente o uso de terapias invasivas, e o aumento do uso de antimicrobianos de amplo espectro (Higueta & Huycke, 2014). Dessa forma, quando assumem o papel de patógenos, os enterococos expressam uma série de genes de virulência que permitem a invasão e aderência tecidual, a modulação do sistema imune e danos através da liberação de bacteriocinas, os quais favorecem a sua permanência em sítios alternativos aos de colonização habitual (Jett, *et al.* 1994).

Os enterococos estão associados às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e, por isso, a disseminação desses micro-organismos também pode ocorrer de forma exógena. A transmissão entre pacientes ocorre principalmente através das mãos de

profissionais da saúde e dos próprios ambientes hospitalares, assim como demonstrado na figura 1. Essa propagação é favorecida devido à capacidade destas bactérias de sobreviverem em diversas superfícies e em equipamentos médicos, além de possuírem tolerância ao calor, cloro e a algumas soluções com álcool (Fisher & Phillips, 2009; Arias & Murray, 2012).

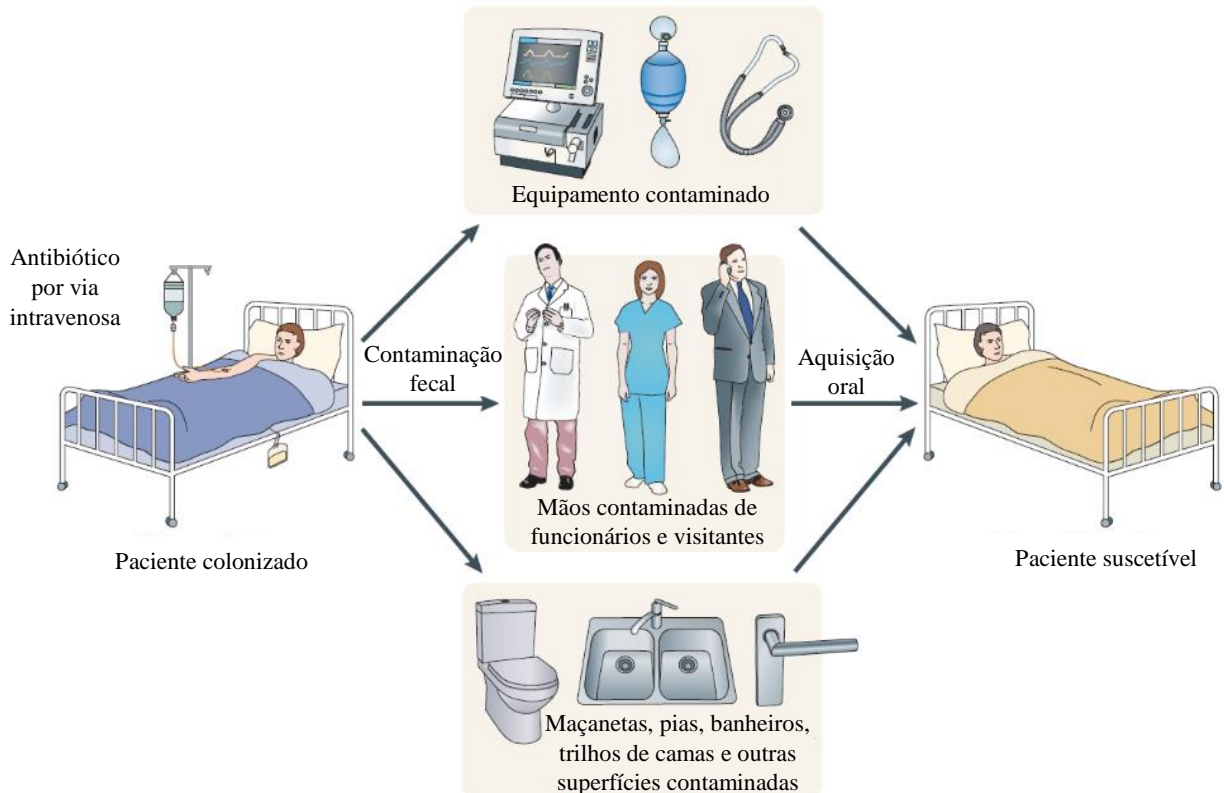


Figura 1: Principais formas de transmissão de enterococos no ambiente hospitalar, demonstrando a forma de disseminação de infecções relacionadas à assistência à saúde (imagem adaptada de Arias & Murray, 2012).

Desta forma, as infecções por enterococos ocorrem com maior frequência em pacientes hospitalizados por longos períodos, imunossuprimidos (principalmente em pacientes oncológicos ou transplantados), com insuficiência renal, com uso de dispositivos médicos invasivos (como cateteres urinários ou venoso central) ou que recebem terapia com múltiplos agentes antimicrobianos (como cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas ou glicopeptídeos) (Malani *et al.*, 2002; Patel, 2004).

As infecções mais comumente associadas aos enterococos incluem as infecções do trato urinário (ITUs), infecções intra-abdominais e pélvicas, endocardites, meningites, bacteremias e septicemia (Koch *et al.* 2004; Sood *et al.* 2008). A espécie *E. faecalis* é responsável pela maior parte das infecções em humanos (em torno de 80 a 90% dos casos),

seguida por *E. faecium* (menos de 10%). Outras espécies como *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus* são responsáveis por infecções clínicas de menor importância (Malani *et al.* 2002).

O diagnóstico de infecção por enterococos é realizado através do isolamento e do cultivo desse micro-organismo a partir de amostras como urina, sangue, líquido intra-abdominal e pélvico ou líquido cefalorraquidiano (Patel, 2004).

1.2. Resistência a antimicrobianos

Os enterococos são reconhecidos como um dos principais agentes de infecções hospitalares, sendo de particular importância sua emergência como patógenos multirresistentes a diversos antimicrobianos, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos ou gravemente doentes em hospitais (Garrido *et al.*, 2014). Devido a sua capacidade de colonizar e permanecer por longos períodos no trato gastrointestinal de pacientes hospitalizados, os enterococos servem de reservatório para transmissão e dispersão de genes de resistência, o que torna o tratamento clínico cada vez mais desafiador (Arias *et al.*, 2010; Van Tyne & Gilmore, 2014).

Enterococcus faecalis e *E. faecium* surgiram como uma das principais causas de IRAS de forma simultânea ao aparecimento de cepas resistentes a maior parte dos antimicrobianos utilizados na rotina clínica (Sherpard & Gilmore, 2002). De maneira geral, os enterococos exibem diversos mecanismos distintos para resistência a maior parte dos antimicrobianos utilizados na área clínica, podendo ser intrínsecos ou adquiridos (Werner *et al.*, 2013; Garrido *et al.*, 2014). Não raro, esses micro-organismos exibem resistência *in vitro* a três ou mais antimicrobianos de classes distintas, o que os classifica como multidroga resistentes (Magiorakos *et al.*, 2012).

Caracteristicamente resistentes a diversos antimicrobianos de forma intrínseca, os enterococos apresentam menor suscetibilidade a cefalosporinas, oxacilina, clindamicina, β -lactâmicos, trimetropim-sulfometoxazol e a baixas concentrações de aminoglicosídeos (Sherpard & Gilmore, 2002). *Enterococcus faecalis* é também intrinsecamente resistente a quinupristina e dalfopristina (Hollenbeck & Rice, 2012). A resistência intrínseca é mediada por genes cromossomais, tipicamente não transferíveis (Huycke *et al.*, 1998).

Além disso, os enterococos possuem capacidade surpreendente de adquirirem resistência, seja pela aquisição de genes provindos de outros micro-organismos resistentes de forma horizontal, ou a partir de mutações genéticas esporádicas. Tanto a resistência intrínseca quanto a adquirida contribuem de forma significativa na sobrevivência e proliferação dessas bactérias no hospedeiro (Patel, 2004).

Esse gênero bacteriano normalmente exibe baixa suscetibilidade aos β -lactâmicos, como a penicilina, ampicilina, piperacilina e imipenem, os quais exercem efeito bacteriostático (Garrido *et al.*, 2014). As cefalosporinas, por exemplo, não são clinicamente úteis no tratamento contra enterococos, sendo também consideradas fatores de risco para infecções por enterococos resistentes à vancomicina (Paterson, 2004). A resistência à ampicilina, contudo, é mais rara em *E. faecalis* e ocorre na maior parte das vezes (90%) em cepas de *E. faecium* isoladas de IRAS (Arias & Murray, 2012). O mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em enterococos está majoritariamente associado à produção de proteínas de ligação a penicilinas (PBP) de baixa afinidade. A quantidade de PBP5, uma das variantes de PBPs produzidas por enterococos, é diretamente proporcional ao nível de resistência e à concentração inibitória mínima (CIM) para esta classe de antimicrobianos, uma vez que essa variante possui baixa afinidade com β -lactâmicos impedindo sua ação na parede celular (Fontana *et al.*, 1996). Por outro lado, a produção de enzimas β -lactamases, mecanismo comum em diversos outros micro-organismos, é raramente observada em espécies de *Enterococcus* sp. Ao contrário das PBPs, a produção de β -lactamases é constitutiva, e os genes codificantes podem ser encontrados tanto em plasmídeos, quanto em cromossomos (Murray, 1992).

Todos os enterococos apresentam uma resistência moderada aos aminoglicosídeos devido ao seu metabolismo anaeróbico facultativo, o qual restringe a absorção desses antimicrobianos, uma vez que essa absorção depende de energia oxidativa gerada na membrana celular (Leclercq *et al.*, 1992; Chow, 2000). Por isso, para alcançar um efeito bactericida eficaz, os aminoglicosídeos como a gentamicina e a estreptomicina são normalmente associados aos β -lactâmicos (como a ampicilina) ou aos glicopeptídeos (como a vancomicina). A associação desses antimicrobianos produz um efeito sinérgico, pois os β -lactâmicos interferem na formação da parede celular bacteriana facilitando a entrada de aminoglicosídeos, o que permite seu efeito bactericida de inibição de síntese de proteínas (Arias & Murray, 2008).

Entretanto, esse efeito sinérgico pode ser anulado quando há a presença de genes adquiridos que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, responsáveis por

conferir alta resistência a essa classe de antimicrobianos (Chow, 2000). Tais enzimas catalisam modificações covalentes em grupos amino e hidroxila na molécula, diminuindo a sua afinidade por ribossomos e, como consequência, aumentam o nível de resistência (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Assim, essas enzimas são nomeadas de acordo com o sítio modificado na estrutura química do antimicrobiano (fosfotransferases, nucleotidiltransferases e acetiltransferases) (Leclercq *et al.*, 1992). O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, que codifica a enzima modificadora de aminoglicosídeos AAC(6')-APH(2''), é clinicamente um dos mais importantes, uma vez que confere resistência a todos os aminoglicosídeos clinicamente utilizados (incluindo à gentamicina), exceto à estreptomicina (Chow, 2000).

As fluoroquinolonas são agentes antibacterianos sintéticos, que possuem grande espectro de ação. Como resultado, antimicrobianos como ciprofloxacino e norfloxacino, podem ser utilizados para tratar diversas infecções, sendo escolhidos também para o tratamento de ITUs (Naher, 1996). Entretanto, em enterococos, as quinolonas mostram de baixa a moderada atividade em consequência ao aumento do uso desses fármacos na rotina clínica, o que elevou o número de isolados resistentes (Yasufuku *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2014). O mecanismo de resistência está preferencialmente relacionado com a alteração de aminoácidos na subunidade GyrA da DNA girase, ou na subunidade ParC da topoisomerase IV, denominadas regiões determinantes de resistência às quinolonas (*Quinolone Resistance Determining Region*, QRDR), o que torna essas enzimas menos suscetíveis a ação das fluoroquinolonas (Kanematsu *et al.*, 1997; Hooper, 2002).

O uso de tetraciclina para o tratamento de infecções clínicas tornou-se limitado, uma vez que a resistência a esses antimicrobianos se tornou comum em diversos gêneros bacterianos (Speer *et al.*, 1992). Em enterococos, a resistência às tetraciclina é muito comum em isolados clínicos, podendo ser adquirida através de diversos genes, que atuam por diferentes mecanismos de ação. Genes como *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* são responsáveis por conferir proteção ribossomal à célula, reduzindo a associação da tetraciclina aos ribossomos (Connell *et al.*, 2003; Huys *et al.*, 2004). Um segundo mecanismo de resistência é atribuído aos genes *tet(L)* e *tet(K)*, que conferem bombas de efluxo celular dependentes de energia, diminuindo a concentração das tetraciclina no interior da célula (Huys *et al.*, 2004).

As oxazolidinonas, que possuem como principal representante a linezolida, apresentam ação antibacteriana significativa contra bactérias Gram-positivas. A linezolida, por exemplo, é utilizada em micro-organismos multirresistentes e inclusive isolados de enterococos resistentes à vancomicina (Fines & Leclercq, 2000). A linezolida possui mecanismo de ação bacteriostático, o qual inibe a síntese proteica através da ligação com a

subunidade 50S ribossomal, no sítio da peptidil-transferase do 23S rRNA, bloqueando a formação de um complexo entre o ribossomo, RNA transportador e RNA mensageiro (Fung *et al.*, 2001). A resistência a esse antimicrobiano está relacionada a uma mutação na região do gene que corresponde a atividade da peptidil-transferase no rRNA 23S (Prystowsky *et al.*, 2001).

A resistência à rifampicina é comum entre enterococos e, por essa mesma razão, não é comumente utilizada em infecções causadas por esses micro-organismos. O mecanismo de resistência envolve mutações em sítios específicos do gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, local de ligação desse antimicrobiano. Esse mecanismo pode estar relacionado, em parte, com a exposição de enterococos comensais à rifampicina, no tratamento de infecções de outros micro-organismos (Kristich *et al.*, 2014).

A classe dos macrolídeos é utilizada no tratamento clínico de infecções causadas por enterococos, sendo a eritromicina um dos principais representantes dessa classe (Garrido *et al.*, 2014). O uso disseminado dos macrolídeos, tanto no ambiente clínico, quanto em animais para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, levou ao aumento de cepas resistentes a esses antimicrobianos entre esses micro-organismos (Jaglic *et al.*, 2011). Os mecanismos de resistência aos macrolídeos, à lincosamida e à estreptogramina B são compartilhados entre bactérias Gram-positivas, sendo conhecido como resistência aos antimicrobianos MLS_B (*Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B*) (Pechère *et al.*, 2011). A resistência adquirida a esses antimicrobianos envolve três mecanismos distintos: a alteração no sítio de ligação por uma mutação pontual, bombas de efluxo e inativação do fármaco (Portillo *et al.*, 1999). A metilação do 23S rRNA atribuída pelos genes *erm*, confere uma mudança conformacional no sítio de ligação dos macrolídeos para que a síntese proteica não seja interrompida, gerando altos índices de resistência (Roberts, 2008; Pechère *et al.*, 2011). Entre os genes *erm*, o *ermB* é frequentemente encontrado no genoma de enterococos (Jensen *et al.*, 1998).

Com o advento da transmissão de genes de resistência a antimicrobianos, o uso de glicopeptídeos como a vancomicina e a teicoplanina cresceu expressivamente no tratamento de infecções enterocócicas, sendo alguns enterococos isolados de fezes de pacientes hospitalizados os primeiros micro-organismos a revelarem resistência mediada por plasmídeos a esses antimicrobianos (Leclercq, 1989; Shepard & Gilmore, 2002). Desde então, a resistência a glicopeptídeos constitui um dos fatores mais importantes para o controle e estudo dos enterococos, uma vez que o surgimento de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) tornou o tratamento clínico mais desafiador, limitando as opções terapêuticas (Klein,

2003; Khair *et al.*, 2013). As infecções causadas por ERVs são mais frequentes em pacientes hospitalizados, uma vez que o uso de certos agentes antimicrobianos pode agir de forma seletiva, favorecendo a colonização gastrointestinal desses micro-organismos (Arias & Murray, 2012). No Brasil, os primeiros ERVs foram isolados em 1996 em Curitiba, sendo esses micro-organismos também resistentes a diversos outros antimicrobianos (Dalla Costa *et al.*, 1998). Atualmente, no Brasil os ERVs são mais prevalentes em *E. faecalis* do que em *E. faecium*, contrariando o perfil encontrado na Europa e nos Estados Unidos (Rossi, 2011). O mecanismo de ação de glicopeptídeos envolve basicamente a inibição da síntese da parede celular bacteriana através da formação de complexos com resíduos de peptidil-D-alanil-D-alanina, precursores de peptidoglicanos (Arthur & Quintiliani, 2001).

A resistência à glicopeptídeos ocorre devido a diversos fenótipos de resistência, sendo *vanA* e *vanB* os principais fenótipos, localizados em elementos genéticos móveis transferíveis por conjugação e ativados por indução (Arthur & Quintiliani, 2001). Em ambos os fenótipos, a resistência ocorre através da modificação do alvo para resíduos de peptidil-D-alanil-D-lactato, o que reduz a afinidade entre os glicopeptídeos e a parede celular bacteriana. A resistência à vancomicina e à teicoplanina é mediada por nove genes contidos em *vanA*, conferindo níveis elevados de resistência (Werner *et al.*, 2008). Por outro lado, *vanB* confere resistência apenas à vancomicina em enterococos, que permanecem sensíveis à teicoplanina, uma vez que esse último antimicrobiano não induz a transcrição de genes de resistência (Arthur & Quintiliani, 2001).

Mesmo com o surgimento de enterococos resistentes a diversos antimicrobianos, os nitrofuranos como a nitrofurantoína têm sido utilizados por décadas no tratamento clínico de ITUs, visto que esses micro-organismos possuem alta suscetibilidade a esses antimicrobianos (Butt *et al.*, 2004). O mecanismo de ação da nitrofurantoína envolve a sua redução no citoplasma celular por flavoproteínas presentes na parede celular, que convertem a molécula em intermediários reativos. Essas moléculas, por sua vez, danificam as enzimas-chave, incluindo as responsáveis pela síntese de DNA, RNA, proteínas e outras enzimas de metabolização, como as de carboidratos, tendo um efeito bacteriostático e bactericida bastante eficaz (Guay, 2001; Meena *et al.*, 2017). Devido ao mecanismo de ação complexo e em múltiplos sítios, a resistência a nitrofurantoína é rara e, até o momento, não foi detectada resistência cruzada entre a nitrofurantoína e outros agentes antimicrobianos (Meena *et al.*, 2017).

Alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* sp. foram demonstrados na figura 2.

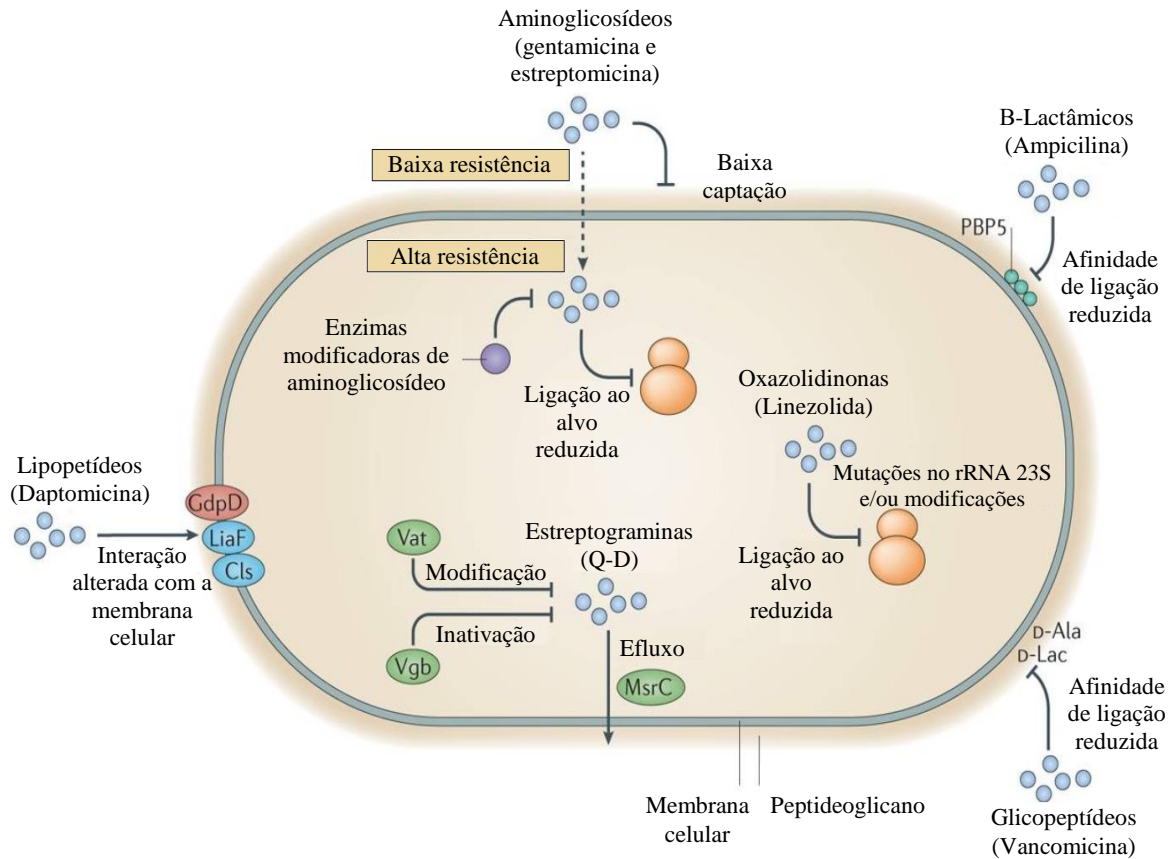


Figura 2: Possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos encontrados em bactérias do gênero *Enterococcus* sp. (Figura adaptada de Arias & Murray, 2012).

1.3. Infecções do trato urinário e *Enterococcus* sp.

As ITUs são uma das infecções bacterianas mais comuns e prevalentes em adultos, afetando mais de 150 milhões de pessoas por ano em todo o mundo (De Rossi *et al.*, 2009; Flores-Mirelles, 2015). As ITUs em geral são influenciadas por múltiplos fatores, tais como a idade, sexo, presença de diabetes, gravidez, danos na coluna cervical, imunossupressão, presença de cateteres e/ou anormalidades anatômicas no trato urinário (Ronald, 2002; Foxman 2002). São classificadas de acordo com o sítio acometido, sendo designadas como cistites, quando comprometem o trato inferior, ou pielonefrites, quando comprometem o trato urinário superior. As infecções podem ser sintomáticas ou assintomáticas, trazendo consequências que variam desde uma pequena irritação local até a bacteremia, sepse ou morte (Foxman, 2002). Sintomas frequentes incluem o aumento da frequência urinária, disúria, dor suprapúbica e na região lombar, podendo haver febre durante a infecção (Bharti *et al.*, 2016).

A prevalência dos agentes etiológicos e a suscetibilidade a antimicrobianos variam conforme a região estudada, o que influencia tanto no critério diagnóstico, quanto no direcionamento do tratamento (Nerurkar *et al.*, 2012). Normalmente, o diagnóstico de ITUs é realizado através do exame de urina, que confirma a presença de, em média, uma quantidade superior a 10^5 células bacterianas por mL de amostra. Além disso, uma quantidade significativa de hemácias e leucócitos também pode ser encontrada na urina (Lopes & Tavares, 2005; Bharti *et al.*, 2016). A urocultura quantitativa coletada de uma amostra de urina asséptica é considerada padrão ouro para diagnóstico de ITU e indica, na maior parte dos casos, qual o agente etiológico envolvido. De forma complementar, também pode ser realizado o teste de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos ou antibiograma nos casos de infecções complicadas, a fim de selecionar antimicrobianos para uma terapia eficaz (Lopes & Tavares, 2005).

As ITUs podem também ser classificadas em não complicadas ou complicadas. As consideradas não complicadas ocorrem frequentemente em indivíduos saudáveis, sem anormalidades anatômicas, acometendo principalmente mulheres jovens e em idade sexual ativa. Por outro lado, ITUs complicadas estão associadas a fatores que aumentam o risco da infecção, ou que aumentam o fracasso do tratamento, sendo normalmente assintomáticas (Hooton & Stamm, 1997; Flores-Mireles, 2015). As ITUs decorrentes de complicações hospitalares são frequentes e permitem que micro-organismos que raramente ocasionam infecções em pacientes saudáveis causem infecções mais sérias (Ronald, 2002). Dessa forma, as IRAS mais frequentemente associadas aos enterococos ocorrem no trato urinário (Malani *et al.*, 2002).

Dentre os uropatógenos, os enterococos emergiram entre os principais agentes isolados de ITUs complicadas adquiridas em ambientes hospitalares (11%), principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTI), perdendo apenas para *Escherichia coli* uropatogênica (Shankar *et al.*, 2001; Malani *et al.*, 2002; Flores-Mireles, 2015). Entre as espécies de *Enterococcus* sp., *E. faecalis* é a espécie predominante em infecções clínicas, seguida por *E. faecium* (Swaminathan & Alangaden, 2010).

As ITUs causadas por enterococos incluem a cistite, pielonefrite, prostatite e abscesso perinefrético, sendo mais prevalentes no sexo feminino e raramente associadas a ITUs não complicadas (Felmingham *et al.*, 1992; Patel, 2004). Estão fortemente relacionadas ao uso de cateteres, presença de alterações funcionais ou estruturais do trato urinário, desordens imunes, renais ou metabólicas (Patel, 2004; Kline & Lewis, 2016). Em ITUs associadas ao uso de cateteres e outros instrumentos urinários, os enterococos desempenham um papel prevalente,

estando entre os principais micro-organismos isolados, aumentando o risco de morbidade, mortalidade e a infecção por micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos (*multiple drug resistant* – MDRs). A facilidade de colonização e persistência nessas superfícies se deve a capacidade de aderência e formação de biofilmes graças à presença de diversos fatores de virulência (Flores-Mirelles, 2015; Kline & Lewis, 2016). Por isso, quando confirmado o diagnóstico de ITUs por enterococos, a remoção de cateteres ou *stents* urinários é de extrema importância no processo terapêutico (Swaminathan & Alangaden, 2010).

As ITUs causadas por *E. faecalis* podem ser problemáticas, uma vez que os isolados dessas infecções frequentemente carregam múltiplos genes de resistência por surgirem de ambientes hospitalares e pelo uso inadequado de antimicrobianos (Swaminathan & Alangaden, 2010; Nerurkar *et al.*, 2012).

O tratamento de ITUs é sempre recomendado aos pacientes com sinais e sintomas clássicos associados. Para enterococos considerados multidroga-resistentes, a ampicilina pode ser administrada como monoterapia ou em associação a aminoglicosídeos (Swaminathan & Alangaden, 2010). A vancomicina pode ser utilizada em enterococos não ERVs, principalmente em pacientes que exibem alergia a penicilinas (Miller *et al.*, 2016). Alguns agentes também frequentemente utilizados incluem a nitrofurantoína, linezolida, fosfomicina, fluoroquinolonas e o cloranfenicol, sendo esses também recomendados para casos de ERVs (Swaminathan & Alangaden, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Sendo *Enterococcus faecalis* um dos fatores associados às ITUs, o estudo e a análise da suscetibilidade de *E. faecalis* aos antimicrobianos isolados de amostras de urina poderão ser empregados futuramente no melhor entendimento do mecanismo de disseminação de resistência bacteriana. Dessa forma, a análise da sensibilidade desses antimicrobianos e da frequência de genes de resistência nesses micro-organismos torna-se relevante no direcionamento de uma terapia eficaz, evitando que esses micro-organismos sobrevivam em sítios não habituais que podem prejudicar o hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos em *Enterococcus faecalis* isoladas a partir de amostras de urina, bem como detectar o perfil de resistência genética desses microorganismos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de suscetibilidade de *E. faecalis* isolados de amostras de urina.
- Detectar a presença de genes de resistência a antimicrobianos das cepas de *E. faecalis*.
- Comparar o perfil de resistência das cepas de *E. faecalis* com o sexo do hospedeiro.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Formato exigido pela revista “Sociedade Brasileira de Medicina Tropical”.

**Análise do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e detecção de genes de resistência
em *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de urina**

Caroline Rossi Canani¹, Renata Oliveira Soares², Letícia da Fontoura Xavier Costa¹, Tíela Trapp Grassotti¹, Pedro Alves D’Azevedo², Ana Paula Guedes Frazzon¹

1. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Laboratório de Cocos Gram Positivos (LCGP), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Rua Sarmiento Leite, 500. Bairro Farrroupilha – Sala 216

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

CEP: 90050-170

Fone: +55 (51) 3308-4505

Endereço de e-mail: ana.frazzon@ufrgs.br

RESUMO

Introdução: Os enterococos são patógenos oportunistas associados a infecções relacionadas à assistência à saúde. Dentro deste gênero, a espécie *Enterococcus faecalis* é considerada a mais prevalente, causando mais frequentemente infecções do trato urinário. Tais infecções tornam-se importantes uma vez que esses micro-organismos possuem grande capacidade de adquirir genes de resistência a antimicrobianos. O objetivo desse estudo foi avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos e detectar o perfil de resistência genética em *E. faecalis* isoladas a partir de amostras de urina. **Métodos:** Foram selecionadas 60 cepas de *Enterococcus* sp. isoladas de pacientes com infecções urinárias em um hospital geral de Porto Alegre. As cepas da espécie *E. faecalis* foram submetidas à técnica de disco-difusão frente a 13 antimicrobianos e a testes de concentração inibitória mínima. Também foi determinado o perfil genético a partir da técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose para genes de resistência a antimicrobianos. **Resultados:** Foram selecionadas 51 cepas de *E. faecalis*, sendo que 47 (92,1%) apresentaram resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, anfenicóis, beta-lactâmicos, quinolonas, macrolídeos e/ou oxazolidinonas pelo teste de disco-difusão, mostrando um perfil de múltipla resistência em 58,8% das cepas. Em relação aos genes de resistência como o *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(S)*, *ermB*, e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 64,7% das cepas apresentaram pelo menos um dos genes testados. **Conclusões:** Dentre as cepas, 92,1% apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos, sendo também encontradas diversas multirresistentes. O presente estudo reflete a capacidade desse micro-organismo de disseminar genes de resistência devido à pressão seletiva que frequentemente ocorre em hospitais.

Palavras-chave: enterococos; resistência; antimicrobianos; gene de resistência; infecções do trato urinário;

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* sp. compreende bactérias comensais em humanos, pertencentes principalmente ao trato gastrointestinal¹. Esse gênero bacteriano também pode ser encontrado naturalmente na cavidade oral, trato urogenital e na superfície da pele². Entretanto, esses micro-organismos podem assumir o papel de patógenos oportunistas, sendo capazes de invadir, modular o sistema imune e se aderir em sítios alternativos aos de colonização habitual, causando infecções mais sérias^{3,4}. Por esta razão, os enterococos estão associados a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), podendo a disseminação desses micro-organismos ocorrer de forma exógena e endógena^{5,6}.

Os principais fatores de risco para infecções por enterococos incluem a imunossupressão e o uso de múltiplos antimicrobianos, que aumentam a patogenicidade e a pressão seletiva favorecendo a disseminação de genes de resistência^{6,7}. Tais infecções também estão fortemente associadas à insuficiência renal e ao uso de dispositivos médicos invasivos (como cateteres urinários ou venosos)^{8,9}. Dentre as espécies responsáveis por infecções clínicas no gênero, *Enterococcus faecalis* se destaca como principal micro-organismo observado⁸.

As infecções do trato urinário (ITUs), como cistites, pielonefrites, prostatite e abscesso perinefrético são as infecções clínicas causadas por enterococos mais frequentemente em adultos^{9,10}. Essas infecções são mais prevalentes em pacientes do sexo feminino, sendo majoritariamente infecções do tipo complicadas¹¹. De maneira geral, as ITUs estão fortemente associadas ao uso de cateteres urinários, alterações funcionais ou estruturais do trato urinário e a desordens imunes, metabólicas ou renais¹².

As ITUs causadas por enterococos frequentemente se tornam problemáticas e limitadas a poucas opções terapêuticas, uma vez que enterococos como *E. faecalis*, isolados dessas infecções, frequentemente carregam múltiplos genes de resistência devido ao ambiente

hospitalar e ao uso inadequado de antimicrobianos^{13,14}. Por ser caracteristicamente resistente de forma intrínseca e capaz de adquirir genes de resistência a diversos antimicrobianos utilizados na área clínica^{15,16}, o estudo e a análise de suscetibilidade de *E. faecalis* torna-se importante no entendimento do mecanismo de disseminação de resistência bacteriana e no possível direcionamento futuro de uma terapia eficaz. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de *E. faecalis* oriundas de amostras clínicas de urina, bem como detectar o perfil de resistência genética desses micro-organismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos

A partir do banco de amostras do laboratório de Cocos Gram-positivos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), foram selecionadas 60 cepas clínicas de *Enterococcus* sp. (sendo 37 de indivíduos do sexo feminino e 23 do sexo masculino).

Tais cepas haviam sido coletadas previamente em um estudo conduzido por Soares *et al.* (2014)¹⁷ de um hospital geral de Porto Alegre, Brasil, no período de setembro de 2012 a agosto de 2013, sob o parecer nº 1.283.544 do Comitê em Ética e Pesquisa da UFCSPA. As cepas foram mantidas à -20°C em *skim milk* (Difco™ Skim Milk) até o momento da reativação. Todas as cepas foram testadas para a hidrólise de esculina, coloração de Gram e teste da catalase.

Confirmação fenotípica da espécie *Enterococcus faecalis*

Inicialmente, para a confirmação de gênero, as cepas oriundas de diferentes pacientes foram submetidas ao crescimento em caldo Enterococcosel (Difco™), a fim de reafirmar o isolamento de bactérias do gênero *Enterococcus* sp. Após a confirmação, os isolados foram

semeados em meio sólido ágar Mueller-Hinton (MH) acrescido de 0,04% de telurito, a fim de selecionar apenas isolados com características da espécie *E. faecalis*, uma vez que, entre os *Enterococcus sp.* de importância médica, somente *E. faecalis* é capaz de tolerar a presença desta substância e se desenvolver nesse meio de cultivo. Como resultado característico da espécie, as bactérias são capazes de metabolizar o telurito e produzir pigmentação negra.

Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo adaptado de Riboldi *et al.* (2009)¹⁸ pelo método de lise química, sendo uma colônia pura de cada cepa cultivada em 1mL do caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C por 24 horas. Após este período, os materiais foram centrifugados por 14.000 rpm durante 10 minutos, e os sobrenadantes removidos. Em seguida, foram adicionados 40µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) para ressuspender os sedimentos, e as cepas foram então incubadas a 100°C por 15 minutos em banho-seco. Ao final, foram adicionados 460µL de TE, e os materiais foram centrifugados novamente a 14.000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes contendo os DNAs foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -20°C.

Confirmação genotípica da espécie *Enterococcus faecalis* por PCR

A confirmação da espécie foi realizada através de teste genotípico, utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual foi analisada a presença do gene *16S rRNA* (específico para a espécie em questão), dispondo da cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 como controle positivo da reação. O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foi descrito na tabela 1.

A reação foi conduzida em um volume total de 25µL, contendo água ultrapura estéril, 10mM de tampão 10X Tris-HCl (pH 8,4), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada

desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4mM para cada oligonucleotídeo iniciador e 1U da enzima Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação foram conduzidos sob as seguintes condições: 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos consecutivos de 94°C por 1 minuto; 66°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de 5 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Ludwig Biotec) na concentração de 1,5%, nas condições de 50V durante 80 minutos.

Testes de suscetibilidade a antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade foram realizados a partir do teste de disco-difusão em ágar, de acordo com os padrões estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2016¹⁹. Após descongelamento do meio de preservação, as cepas foram inoculadas em meio sólido BHI a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Após este período, foram preparadas suspensões bacterianas em tubos, utilizando-se solução salina 0,9% de NaCl estéril e comparadas com a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A partir destas suspensões, as cepas foram semeadas utilizando-se suabes estéreis em placas de Petri contendo meio ágar MH. Nas placas de Petri, foram aplicados discos de papel impregnados com os seguintes antimicrobianos: norfloxacino (10µg), ciprofloxacino (5µg), teicoplanina (30µg), vancomicina (30µg), linezolida (30µg), tetraciclina (30µg), rifampicina (5µg) e eritromicina (15µg) (SENSIDISCTM – DME); e cloranfenicol (30µg), nitrofurantoína (300µg), ampicilina (10µg), estreptomicina (300µg) e gentamicina (120µg) (SENSIFARTM – Cefar). Novamente, as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16-18 horas para a realização da leitura dos halos em milímetros (mm) de todos os antimicrobianos (exceto para a vancomicina, sendo a leitura realizada em 24 horas). Foram consideradas cepas resistentes a múltiplos fármacos (MDRs) as que apresentaram resistência ou resistência intermediária a três

ou mais antimicrobianos de classes distintas, segundo a classificação proposta por Magiorakos *et al.* (2012)²⁰.

Determinação da concentração inibitória mínima para cepas resistentes à gentamicina e à estreptomicina

A técnica de microdiluição em caldo foi realizada para a determinação da CIM para as cepas com halos inferiores ao diâmetro de 9 mm nos discos de gentamicina (120µg) e estreptomicina (300µg) no teste de disco-difusão. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo sob a recomendação do CLSI (2016)¹⁹.

As cepas preservadas, após descongelamento, foram inoculadas em meio sólido BHI a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A partir das culturas de 24 horas, suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,9% de NaCl estéril, ajustadas de acordo com a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A técnica de microdiluição em caldo foi realizada em uma placa de 96 poços estéril, contendo caldo BHI, suspensão bacteriana e solução de estreptomicina (concentração de 1000µg/mL) ou uma solução de gentamicina (concentração de 500µg/mL). Foram preparados controles positivos de crescimento (contendo apenas o meio de cultura e o inóculo) e controle negativo (contendo meio de cultura e o antimicrobiano).

A cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, sensível a ambos os antimicrobianos foi empregada como controle positivo da técnica. Tanto as cepas quanto os controles (positivo de crescimento, negativo e da técnica) foram submetidos aos mesmos testes de microdiluição em triplicata. As microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas para gentamicina ou de 24 até 48 horas para estreptomicina. Foi considerada resistente a cepa capaz de crescer na presença do antimicrobiano, representada por um depósito visível de sedimento celular e pelo aumento de turbidez no meio de cultivo.

Detecção dos genes de resistência

A detecção de genes para resistência a antimicrobianos foi realizada através da técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5%. Foram analisados 7 genes relacionados à resistência a antimicrobianos em *E. faecalis*, sendo eles: *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(S)*, *ermB*, *msrC* e *aac(6³)-Ie-aph(2^{''})-Ia*.

As técnicas de PCR para cada gene foram conduzidas através de protocolos adaptados, com conjuntos de oligonucleotídeos previamente descritos (tabela 1). A técnica foi conduzida nas mesmas condições descritas anteriormente para a identificação da espécie bacteriana, alterando somente a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

Análise Estatística

Análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software SPSS versão 18.0, no qual foi realizado o teste de Qui-quadrado (ou teste exato de Fisher, quando apropriado), considerando-se valores $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Isolados clínicos de urina e confirmação da espécie

Das 60 cepas selecionadas, todas resultaram em reações positivas para hidrólise de esculina formando um complexo de coloração castanho-escuro em caldo *Enterococcosel*. Entretanto, quando semeadas em meio sólido MH acrescido de 0,04% de telurito e analisadas pela PCR, 51 (85%) confirmaram pertencer à espécie de *E. faecalis*.

Das 51 cepas selecionadas neste estudo, 29 foram isoladas de indivíduos do sexo feminino (56,8%), com idade média de 52,1 anos (DP de $\pm 22,8$ anos), e 22 de indivíduos do sexo masculino (43,2%), com idade média de 58,5 anos (DP de $\pm 22,9$).

Suscetibilidade aos antimicrobianos

Quarenta e sete cepas (92,1%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado pelo método de disco-difusão, sendo encontradas cepas com perfil fenotípico de resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclínas, anfenicóis, beta-lactâmicos, quinolonas, macrolídeos e às oxazolidinonas. Quando comparado o perfil de resistência das cepas com o sexo do paciente, não houve correlação estatística pelo teste Qui-quadrado entre o sexo dos pacientes selecionados para o estudo e *E. faecalis* considerados resistentes ou resistentes intermediários ($p < 0,440$). O número de cepas resistentes para cada antimicrobiano, tanto no sexo feminino, quanto no sexo masculino, foi demonstrado na figura 1.

Em relação às cepas, apenas uma (1,96%) foi resistente à ampicilina, sendo essa também resistente intermediária à linezolida. Doze (23,53%) e nove (17,65%) cepas apresentaram perfil de resistência ou resistência intermediária ao ciprofloxacino, respectivamente. Para norfloxacino, dezessete (33,33%) cepas foram resistentes e doze (23,52%) resistentes intermediários.

Para a rifampicina, nove (17,64%) cepas demonstraram ser resistentes e seis (11,76%) resistentes intermediários. Dez (19,6%) cepas foram resistentes e uma (1,96%) resistente intermediária ao cloranfenicol. Das 51 cepas testadas, 31 (60,78%) apresentaram resistência e sete (13,72%) resistência intermediária à eritromicina. Por fim, 38 (74,5%) cepas foram resistentes à tetraciclina. Nenhuma das cepas analisadas se mostrou resistente e/ou resistente intermediária à nitrofurantoína, vancomicina e teicoplanina.

Quando agrupadas de acordo com a classe antimicrobiana, as cepas apresentaram maior suscetibilidade aos nitrofuranos e aos glicopeptídeos, as quais todas se mostraram, pelo teste de disco-difusão em ágar, suscetíveis. A classe dos macrolídeos abriga o maior número de cepas resistentes apresentando 66,67% dessas cepas.

Dentre as cepas de *E. faecalis* avaliadas, sete (13,7%) obtiveram halos menores que 9 mm de diâmetro no teste de disco-difusão em ágar para gentamicina e onze (21,5%) para estreptomicina. A confirmação da resistência foi dada pela técnica de microdiluição em caldo, confirmando o valor da CIM. A avaliação da resistência pela técnica de microdiluição confirmou resistência à gentamicina e à estreptomicina para seis (11,7%) e dez (19,6%) cepas, respectivamente.

Dentre as cepas analisadas, 58,8% apresentaram-se como resistentes a múltiplos fármacos (MDRs) pelo teste de disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo.

Avaliação do perfil genético

O resultado do perfil genotípico de resistência das cepas avaliadas está apresentado na tabela 2. Dentre as cepas consideradas resistentes ou resistentes intermediárias à tetraciclina pelo teste de disco-difusão em ágar, 29 (76,3%) apresentaram o gene *tet(M)*, cinco (13,2%) o gene *tet(L)* e quatro (10,5%) o gene *tet(S)*. Dentre os três genes para a resistência a tetraciclina, somente o gene *tet(M)* apresentou correlação estatística com o perfil fenotípico ($p < 0,001$).

Das 38 cepas consideradas resistentes ou resistentes intermediários à eritromicina, 19 (50%) amplificaram um fragmento de DNA esperado de 639pb referente ao gene *ermB*, havendo correlação estatística com o perfil fenotípico observado ($p < 0,01$). O gene *msrC* não foi encontrado para nenhuma das cepas analisadas. Dentre as seis cepas consideradas resistentes ou resistentes intermediárias à gentamicina, três (50%) apresentaram o gene *aac-(6')/aph(2'')*, havendo correlação estatística com o perfil fenotípico observado ($p < 0,02$).

A figura 2 demonstra os pesos moleculares dos fragmentos de DNA em pares de bases esperados para os genes amplificados pela PCR.

DISCUSSÃO

Os enterococos surgiram entre os principais micro-organismos que possuem o potencial de adquirir resistência a todos antimicrobianos utilizados em tratamentos clínicos²¹. A resistência aos antimicrobianos utilizados tem se tornado cada vez mais alarmante, o que fez com que profissionais da saúde tomassem diferentes estratégias tanto na prescrição de antimicrobianos, quanto em medidas de prevenção a infecções²².

Neste estudo, 30 (58,8%) de *E. faecalis* apresentaram-se resistentes a pelo menos três antimicrobianos de classes distintas no teste de disco-difusão em ágar, sendo por isso classificadas como cepas multidroga resistentes. Esse índice elevado de múltipla resistência encontrado reflete a grande capacidade desses micro-organismos de adquirir e/ou disseminar genes de resistência, o que ocorre principalmente devido à pressão seletiva frequente em hospitais. Sharifi e colaboradores (2013)²³, em um estudo sobre resistência a antimicrobianos e virulência em 188 cepas de enterococos isolados de urina em hospitais universitários no Iran, encontraram cepas de enterococos MDRs em índices elevados, totalizando 138 isolados (73,4%). Entretanto, essa resistência residiu de forma mais prevalente em *E. faecium* que em *E. faecalis*, ainda que esse último seja mais predominante em infecções urinárias.

No presente estudo, as classes de antimicrobianos com maiores frequências de resistência observados foram as tetraciclínas, macrolídeos e as quinolonas. De acordo com a literatura, a resistência a essas classes é comumente encontrada em enterococos. Em um estudo conduzido em 2016 no norte da Índia, a resistência a antimicrobianos em 115 enterococos isolados de ITUs foi mais expressiva na tetraciclina (77,4%), ciprofloxacino (74,8%) e norfloxacino (66,1%)²⁴, os quais também se apresentaram com os maiores índices de resistência no presente estudo.

No caso da tetraciclina, o perfil genotípico encontrado demonstrou uma correlação direta entre *tet(M)* e a presença de resistência fenotípica a esse antimicrobiano, ao contrário

dos genes *tet(L)* e *tet(S)*, devido a menor frequência no qual se apresentaram. De forma similar, o gene *ermB* apresenta forte correlação com o perfil fenotípico encontrado de resistência a eritromicina, ao contrário do gene *msrC*. O gene *ermB* tem sido associado aos enterococos em diversos estudos, sendo um dos mais prevalentes entre os genes que conferem resistência à eritromicina no gênero, corroborando com os resultados encontrados. Um estudo de prevalência de resistência a macrolídeos em *Staphylococcus aureus* e *E. faecium* isolados de 24 hospitais universitários europeus, encontrou resistência a eritromicina conferida por *ermB* em 90,7% dos isolados de *E. faecium*, mas apenas em 1,9% de *S. aureus*²⁵.

A resistência a aminoglicosídeos ganhou importância clínica entre o enterococos, uma vez que esses antimicrobianos são também uma opção de escolha para tratamento. Uma porcentagem significativa de cepas analisadas nesse estudo apresentou altos níveis de resistência à gentamicina (11,7%) e à estreptomicina (19,6%) pelo teste de CIM, totalizando em 31,3% das cepas resistentes a aminoglicosídeos. Dentre as cepas consideradas resistentes à gentamicina, 50% apresentaram o gene *aac-(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Uma vez que a resistência à gentamicina pode ser conferida por mais de um gene adquirido, os dados obtidos no presente estudo reafirmam a prevalência do gene avaliado, assim como descrito na literatura. Em um estudo conduzido na Índia no período de 2010 a 2015²⁶, em um total de 178 isolados de *Enterococcus* sp., a resistência aos aminoglicosídeos foi ainda mais preeminente. Dentre os isolados analisados, 129 (72,4%) demonstraram resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos, sendo 76 (42,7%) resistentes a altas concentrações de gentamicina pelo teste de CIM. Ainda, desses 76, 52 (68,4%) apresentaram o gene *aac-(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, sendo esse também o mais prevalente entre os quatro genes avaliados para resistência à gentamicina.

Neste trabalho, nenhuma das cepas isoladas de amostras de infecções urinárias apresentou resistência fenotípica à vancomicina ou à teicoplanina. Entretanto, a prevalência de ERVs em amostras clínicas de urina continua sendo um fator que demanda grande atenção

por parte dos profissionais da saúde, visto que boa parte dos ERVs são também resistentes a outros antimicrobianos utilizados para tratamento. Além disso, a vancomicina é também utilizada como última opção para diversas infecções causadas por cocos Gram positivos²⁷. Sandri e colaboradores (2014)²⁸ demonstraram que, entre as amostras clínicas contendo ERVs obtidas de um hospital geral de Porto Alegre, 10% eram amostras provenientes de urina, havendo uma maior predominância de *E. faecalis* resistentes à vancomicina em relação à *E. faecium*, refletindo a sua particular importância da resistência a esses antimicrobianos, especialmente na região sul do Brasil. A ausência de ERVs no presente estudo pode ter decorrido do baixo número amostral, associado ao fato de que a maior parte de ERVs de amostras clínicas são provenientes de outros sítios, como hemoculturas (assim como demonstrado por Sandri e colaboradores).

Da mesma forma que não foram observadas cepas com fenótipo de resistência aos glicopeptídeos, também não foi observada resistência à nitrofurantoína. A resistência à ampicilina e à linezolida foi baixa (1,96%) sendo essa encontrada apenas em uma mesma cepa. Comparativamente a um estudo conduzido no Paquistão com 161 cepas de *E. faecalis* isolados de ITUs²⁹, a suscetibilidade foi maior à vancomicina (98,13%), seguido pela linezolida (97,5%), ampicilina (81,9%) e nitrofurantoína (72%), sendo esse perfil de alta suscetibilidade também encontrado no presente trabalho. Deste modo, para o tratamento clínico de infecções causadas por enterococos, a ampicilina, linezolida, nitrofurantoína e vancomicina (exceto em casos de ERVs) ainda são os principais antimicrobianos de escolha. Outros antimicrobianos como ciprofloxacino e norfloxacino também são frequentemente utilizados no tratamento de ITUs causadas por enterococos. Entretanto, assim como demonstrado e discutido no presente estudo, a frequência de resistência a fluoroquinolonas tem se tornado cada vez mais prevalente entre espécies de *E. faecalis*, o que também limita o uso dos antimicrobianos dessa classe^{30,31}.

Uma vez que pacientes do sexo feminino possuem ITUs com maior frequência devido ao comprimento da uretra³², a utilização mais frequente de antimicrobianos por essa população poderia causar uma pressão seletiva na microbiota normal, favorecendo o surgimento de MDRs. Dessa forma, assim que a colonização no sítio urinário fosse favorecida, esses micro-organismos multirresistentes endógenos poderiam causar infecções futuras, dificultando as opções de tratamento. Entretanto, no presente estudo, não foram encontradas correlações estatísticas entre o sexo dos pacientes e a presença de resistência ou resistência múltipla a antimicrobianos, apesar de uma notável diferença observada na frequência de cepas resistentes entre os sexos, como demonstrado na figura 1. Contudo, a hipótese de correlação estatisticamente significativa poderia ser eventualmente evidenciada com um aumento do número amostral de análise.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflitos de interesse entre os autores em relação à publicação deste artigo.

SUPORTE FINANCEIRO

Este estudo foi amparado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

REFERÊNCIAS

1. Tannock, G.W.; Cook, G. Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans. In: Gilmore M.S. (ed). The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and

- antibiotic resistance, 1 ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2002; p 101-132.
2. Sood, S., Malhotra, M., Das, B. K., & Kapil, A. (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian Journal of Medical Research*, 128(2), 111.
 3. Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462-478.
 4. Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., & Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22(7), 822-830.
 5. Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
 6. Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
 7. Garsin, D. A., Frank, K. L., Silanpaa, J., Ausubel, F. M., Hartke, A., Shankar, N., Murray, B. E. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. In: Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p 185-258.
 8. Malani, P. N., Kauffman, C. A., Zervos, M. J. Enterococcal Disease, Epidemiology and Treatment. In: Gilmore MS. (ed). *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, 1 ed. Washington, DC: American Society For Microbiology, 2002; 301-54.
 9. Patel, R. Enterococos. In: Wilson W. R., Sande M. A., editors. *Doenças Infecciosas - Diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: ArtMed, 2004. p. 83-103.
 10. De Rossi, G. (2011). Infecção urinária não complicada na mulher: diagnóstico. *Revista da Associação Médica Bras*, 57(3), 258-261.

11. Felmingham, D., Wilson, A. P. R., Quintana, A. I., & Grüneberg, R. N. (1992). Enterococcus species in urinary tract infection. *Clinical infectious diseases*, *15*(2), 295-301
12. Kline, K. A., & Lewis, A. L. (2016). Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. *Microbiology spectrum*, *4*(2).
13. Swaminathan, S., & Alangaden, G. J. (2010). Treatment of resistant enterococcal urinary tract infections. *Current infectious disease reports*, *12*(6), 455-464.
14. Nerurkar, A., Solanky, P., & Naik, S. S. (2012). Bacterial pathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*, *21*(21).
15. Garrido, A. M., Gálvez, A., & Pulido, R. P. (2014). Antimicrobial resistance in enterococci. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*.
16. Werner, G., Coque, T. M., Franz, C. M., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., ... & Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci—tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6), 360-379.
17. Soares, R. O., Fedi, A. C., Reiter, K. C., Caierão, J., & d'Azevedo, P. A. (2014). Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in Enterococcus spp. clinical isolates. *Virulence*, *5*(5), 634-637.
18. Riboldi, G. P., Frazzon, J., d'Azevedo, P. A., & Frazzon, A. P. G. (2009). Antimicrobial resistance profile of Enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(1), 125-128.
19. CLSI. *Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standars Institute; 2016.

20. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., *et al.*, (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281
21. Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-569.
22. Anvisa, 2008. Uso Racional de Antimicrobianos e a Resistência microbiana [Internet]. Corrêa L., Silva EU [Citado em: 19 de novembro de 2017]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/ress_outros.htm.
23. Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Naghili, B., Aghazadeh, M., Milani, M., & Bazmany, A. (2013). Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(1), 197.
24. Goel, V., Kumar, D., Kumar, R., Mathur, P., & Singh, S. (2016). Community acquired enterococcal urinary tract infections and antibiotic resistance profile in North India. *Journal of laboratory physicians*, 8(1), 50.
25. Schmitz, F. J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Köhrer, K. & Fluit, A. C. (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 891-894.
26. Padmasini, E., Padmaraj, R., & Ramesh, S. S. (2014). High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *The Scientific World Journal*, 2014.
27. CDC, 1995. Recommendations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance Recommendation of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee

- (HICPAC) [Internet]. [Publicado em 22 de setembro de 1995; Citado em 22 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00039349.htm>.
28. Sandri, A. M., Silva, G. L. D., Soares, S. P. T., Ramos, F., Alcântara, L. R. D., Lutz, L., & Barth, A. L. (2014). Vancomycin resistant *Enterococcus* spp (VRE): follow up during 9 years in a tertiary teaching hospital in southern Brazil. *Clinical and biomedical research. Porto Alegre. Vol. 34, no. 4 (2014), p. 397-402.*
 29. Hussain, A., Sohail, M., & Abbas, Z. (2016). Prevalence of *Enterococcus faecalis* mediated UTI and its current antimicrobial susceptibility pattern in Lahore, Pakistan. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association, 66(10), 1232-1236.*
 30. Ishikawa, K., Matsumoto, T., Yasuda, M., Uehara, S., Muratani, T., Yagisawa, M., *et al.*, (2011). The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy, 17(1), 126-138.*
 31. Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., *et al.*, (2011). Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *Journal of clinical microbiology, 49(11), 3912-3916.*
 32. Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American journal of medicine, 113(1), 5-13.*
 33. Sedgley, C. M., Nagel, A. C., Shelburne, C. E., Clewell, D. B., Appelbe, O., & Molander, A. (2005). Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of oral biology, 50(6), 575-583.*
 34. Aarestrup, F. M. (2000). Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark: chapter 1: introduction. *Apmis, 108(S101), 5-6.*

35. Frazzon, A. P. G., Gama, B. A., Hermes, V., Bierhals, C. G., Pereira, R. I., Frazzon, J. (2010). Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 365-370.
36. Choi, J. M., Woo, G. J. (2015). Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current microbiology*, 70(4), 476-484.
37. Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1817-1824.
38. Werner, G., Hildebrandt, B., & Witte, W. (2001). The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3672-3673.
39. Emaneini, M., Khoramian, B., Jabalameli, F., Beigverdi, R., Asadollahi, K., Taherikalani, M., & Lari, A. R. (2016). Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(4), E197.

ANEXO - TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de PCR para a identificação da espécie e detecção de genes de resistência a antimicrobianos.

Gene-alvo	Sequência do Oligonucleotídeo	Peso molecular esperado (pb*)	Temperatura de anelamento	Referência
<i>E16S rRNA</i>	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC	136	66°C	33
<i>tet(M)</i>	GTAAATAGTGTTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	656	52°C	34
<i>tet(L)</i>	ACTCGTAATGGTTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTAACACG	627	58°C	35
<i>tet(S)</i>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT ACATAGACAAGCCGTTGACC	660	58°C	36
<i>ermB</i>	GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	52°C	37
<i>msrC</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG GTAAACAAAATCGTTCCCG	342	52°C	38
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	55°C	39

*pb: pares de base

Tabela 2: Perfil genético dos genes de resistência das cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras de urina.

Perfil genotípico observado	Número de cepas (Frequência)
<i>tet(M)</i>	9 (17,6%)
<i>tet(L)</i>	2 (3,9%)
<i>tet(S)</i>	1 (2%)
<i>ermB</i>	2 (3,9%)
<i>tet(M), tet(L)</i>	2 (3,9%)
<i>tet(M), ermB</i>	10 (19,6%)
<i>tet(M), aac-(6')/aph(2'')</i>	1 (2%)
<i>tet(M), ermB, aac-(6')/aph(2'')</i>	2 (3,9%)
<i>tet(M), tet(L), ermB</i>	1 (2%)
<i>tet(M), tet(S), ermB</i>	3 (5,9%)
Sensível a todos os genes avaliados	18 (35,3%)

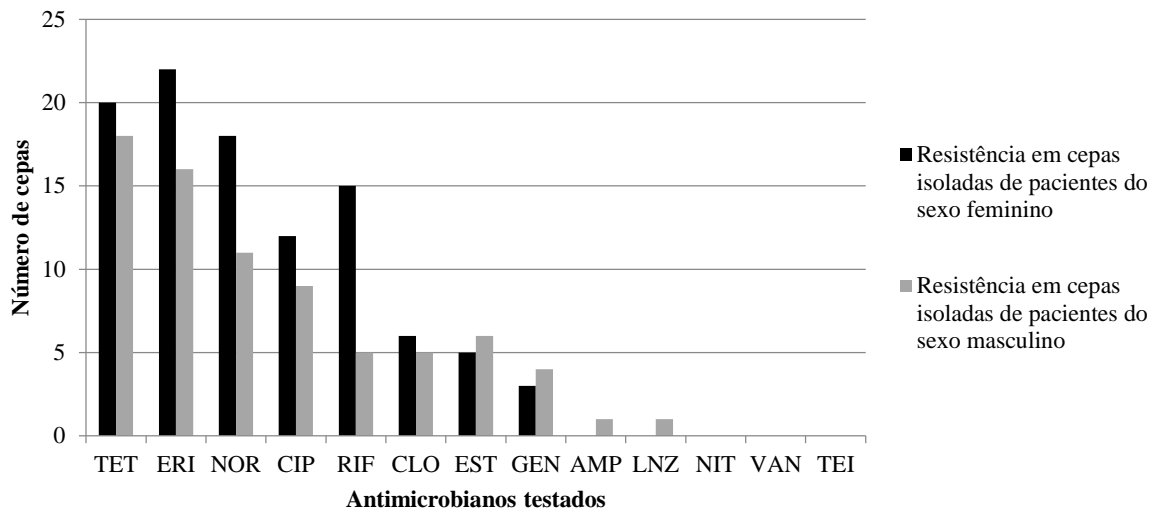


Figura 1: Representação gráfica do perfil de resistência de cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras de urina em relação aos pacientes do sexo feminino e masculino.

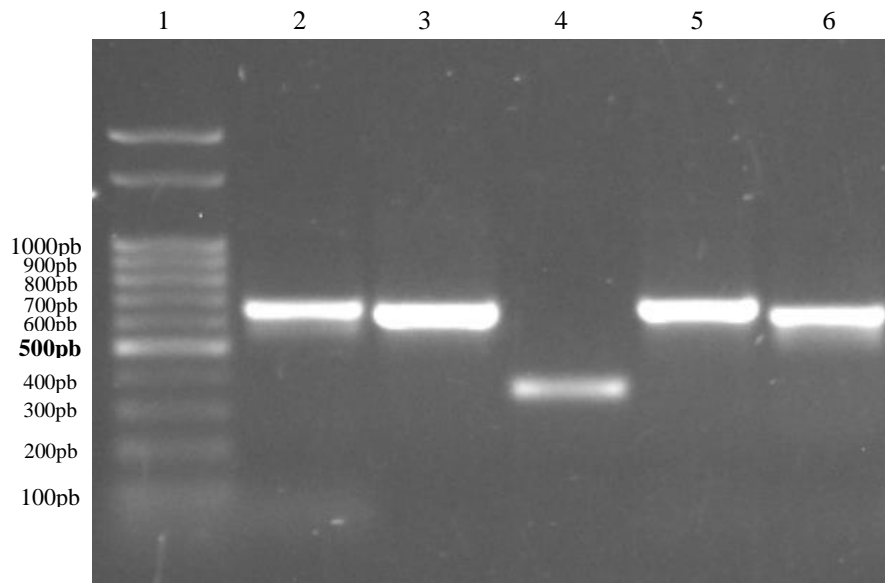


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação gerados pela técnica de PCR convencional para os genes de resistência encontrados nas cepas desse estudo. Na canaleta 1: marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb; canaletas de 2-6: Fragmentos de DNA com peso molecular esperado para os genes *tet(S)*, *ermB*, *aac-(6')/aph(2'')*, *tet(M)* e *tet(L)*, respectivamente.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados no presente estudo permitem concluir que os isolados de *E. faecalis* possuem, na sua maioria, resistência a diversas classes de antimicrobianos, apresentando-se frequentemente como multidroga-resistentes. O perfil de suscetibilidade avaliado para as cepas desse estudo corroboram, na maior parte, com estudos anteriores realizados com a espécie. O presente trabalho demonstrou a presença de alguns genes de resistência, entretanto, diversos outros genes podem ser encontrados em um mesmo isolado, uma vez que esses micro-organismos demonstraram fenotipicamente resistência a diversos antimicrobianos. O perfil de suscetibilidade se demonstrou equivalente tanto para os pacientes do sexo feminino quanto do sexo masculino, entretanto, possíveis diferenças entre os sexos na prevalência de enterococos resistentes pode não ter sido observada devido ao pequeno número amostral, sendo necessário o estudo de mais isolados para confirmar a teoria proposta. Como perspectivas, tem-se o estudo de outros genes de resistência relacionados com os antimicrobianos estudados, além de uma possível comparação com outras espécies do gênero também envolvidas em infecções do trato urinário, como *E. faecium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, 2017. Módulo 4, Gram-positivos: II Enterococcus spp.. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/isol_ent.htm>. Acesso em: 25 de outubro de 2017.

ARIAS, Cesar A.; CONTRERAS, German A.; MURRAY, Barbara E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2010.

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 637-655, 2008.

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

ARTHUR, Michel; QUINTILIANI, Richard. Regulation of VanA-and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 375-381, 2001.

BHARTI, Amit Kumar et al. Incidence of Enterococcal Urinary Tract Infection and it's Sensitivity Pattern among Patients Attending Teerthanker Mahaveer Medical College and Research Centre, Moradabad, India. **International journal of scientific study**, v. 3, n. 12, p. 112-116, 2016.

BUTT, T.; LEGHARI, M. J.; MAHMOOD, A. In-vitro activity of nitrofurantoin in enterococcus urinary tract infection. **JOURNAL-PAKISTAN MEDICAL ASSOCIATION**, v. 54, p. 466-468, 2004.

CONNELL, Sean R. et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3675-3681, 2003.

CHOW, Joseph W. Aminoglycoside resistance in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

DALLA COSTA, L. M. et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-163, 1998.

DE ROSSI, Patrícia et al. Infecção urinária não complicada na mulher: diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 3, p. 258-261, 2011.

FELMINGHAM, D. et al. *Enterococcus* species in urinary tract infection. **Clinical infectious diseases**, v. 15, n. 2, p. 295-301, 1992.

FINES, Marguerite; LECLERCQ, Roland. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 797-802, 2000.

FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FLORES-MIRELES, Ana L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FONTANA, ROBERTA *et al.* Intrinsic penicillin resistance in enterococci. **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 2, p. 209-213, 1996.

FOXMAN, Betsy. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **The American journal of medicine**, v. 113, n. 1, p. 5-13, 2002.

FUNG, Horatio B.; KIRSCHENBAUM, Harold L.; OJOFEITIMI, Babatunde O. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. **Clinical therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 356-391, 2001.

GARRIDO, Antonio Marin; GÁLVEZ, Antonio; PULIDO, Rubén Pérez. Antimicrobial resistance in enterococci. **Journal of Infectious Diseases and Therapy**, 2014.

GARSIN, Danielle A. et al. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. In: GILMORE M.S., CLEWELL D.B., IKE Y., et al., editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p 185-258.

GUAY, David R. An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections. **Drugs**, v. 61, n. 3, p. 353-364, 2001.

HIGUITA, Nelson I. A.; HUYCKE, Mark M. Enterococcus Disease, Epidemiology, and Implications for treatment. In: GILMORE M.S., CLEWELL D.B., IKE Y., et al., editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p 65-101.

HOLLENBECK, Brian L.; RICE, Louis B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HOOPER, David C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 530-538, 2002.

HOOTON, Thomas M.; STAMM, Walter E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics**, v. 11, n. 3, p. 551-581, 1997.

HUYCKE, Mark M.; SAHM, Daniel F.; GILMORE, Michael S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 239, 1998.

HUYS, Geert et al. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1555-1562, 2004.

JAGLIC, Z. et al. Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. **Zoonoses and public health**, v. 59, n. 3, p. 202-211, 2012.

JENSEN, Lars Bogo; FRIMODT-MOLLER, Niels; AARESTRUP, Frank M. Presence of erm gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 151-158, 1999.

JETT, Bradley D.; HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Virulence of enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KANEMATSU, Emiko et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 433-435, 1998.

KHAIR, H. N. et al. Vancomycin resistance has no influence on outcomes of enterococcal bacteriuria. **Journal of hospital infection**, v. 85, n. 3, p. 183-188, 2013.

KLEIN, Günter. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International journal of food microbiology**, v. 88, n. 2, p. 123-131, 2003.

KLINE, Kimberly A.; LEWIS, Amanda L. Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

KOCH, Stefanie et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.

KRISTICH, Christopher J.; RICE, Louis B.; ARIAS, Cesar A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. . In: GILMORE M.S., CLEWELL D.B., IKE Y., *et al.*, (ed). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p

LECLERCQ, Roland et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 3, p. 157-161, 1988.

LECLERCQ, Roland et al. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495-501, 1992.

LEBRETON, Francois; WILLEMS, Rob J. L.; GILMORE, Michael S. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: GILMORE M.S., CLEWELL D.B., IKE Y., *et al.*, (ed). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p 5-64.

LOPES, Hélio Vasconcellos; TAVARES, Walter. Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 6, p. 306-308, 2005.

MALANI, Preeti N., KAUFFMAN, Carol A., ZERVOS, Marcus J. Enterococcal Disease, Epidemiology and Treatment. In: Gilmore MS. (ed). **The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**, 1 ed. Washington, DC: American Society For Microbiology, 2002; 301-54.

MEENA, Suneeta et al. Revisiting Nitrofurantoin for Vancomycin Resistant Enterococci. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 11, n. 6, p. 19, 2017.

MILLER, William R. et al. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 415-439, 2016.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P., GLUPCZYNSKI, Y., TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 727-737, 1999.

MORENO, MR Foulquié *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International journal of food microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

MURRAY, Barbara. E. Beta-lactamase-producing enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 11, p. 2355, 1992.

MURRAY, Barbara. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

NAHER, Kurt G. Fluoroquinolones in Urinary Tract Infections. **Drugs**, v. 52, n. 2, p. 27-33, 1996.

NERURKAR, Alka; SOLANKY, Priti; NAIK, Shanta S. Bacterial pathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)**, v. 21, n. 21, 2012.

PARTE, Aidan C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D613-D616, 2013.

PATEL, R. Enterococos. In: WILSON W. R., SANDE M. A. Doenças Infeciosas - Diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: ArtMed, 2004. p. 83-103.

PATERSON, David L. “Collateral damage” from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 341-345, 2004.

PECHÈRE, J.-C. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. **International journal of antimicrobial agents**, v. 18, p. 25-28, 2001.

PORTILLO, Aránzazu et al. Macrolide Resistance Genes in Enterococcus spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 967-971, 2000.

PRYSTOWSKY, Jason et al. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2154-2156, 2001.

ROBERTS, Marilyn C. Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 282, n. 2, p. 147-159, 2008.

RONALD, Allan. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **The American journal of medicine**, v. 113, n. 1, p. 14-19, 2002.

ROSSI, Flávia. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.

SCHLEIFER, Karl H.; KILPPER-BÄLZ, Renate. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 31-34, 1984.

SHANKAR, Nathan et al. Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, 2001.

SHERMAN, James M. The streptococci. **Bacteriological reviews**, v. 1, n. 1, p. 3, 1937.

SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.

SOOD, Seema et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 2, p. 111, 2008.

SPEER, Brenda S.; SHOEMAKER, Nadja B.; SALYERS, Abigail A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

SWAMINATHAN, Subramanian; ALANGADEN, George J. Treatment of resistant enterococcal urinary tract infections. **Current infectious disease reports**, v. 12, n. 6, p. 455-464, 2010.

TANNOCK, Gerald W.; COOK, Greg. Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans. In: Gilmore MS. (ed). **The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**, 1 ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2002; p 101-132.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. **CR Soc Biol**, v. 5, p. 269-271, 1899.

VAN TYNE, Daria; GILMORE, Michael S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual review of microbiology**, v. 68, p. 337-356, 2014.

WERNER, Guido et al. Antibiotic resistant enterococci - tales of a drug resistance gene trafficker. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 360-379, 2013.

WERNER, Guido; STROMMENGER, Birgit; WITTE, Wolfgang. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. **Future Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 547-562, 2008.

YASUFUKU, Tomihiko et al. Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3912-3916, 2011.

ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *Times New Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Declaração de Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito deve ser limitada ao número real de autores que realmente contribuíram com o manuscrito, exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, que devem limitar-se a vinte autores. Quando exceder a vinte autores, o restante será publicado em notas de rodapé.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de instituições diferentes dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 40 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de

comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos, em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista. No caso de pesquisa em seres humanos, os autores devem incluir na seção métodos no subtítulo Considerações Éticas uma declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separados por vírgula ou por hífen quando houver uma sequência sem intervalo. Ex.: Mundo^{1,2}; Vida^{30,42,44-50}. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus* (Consulte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

A responsabilidade pelas citações bibliográficas contidas no texto e na lista de referências recai exclusivamente sobre os autores.

Alguns exemplos de referências:

1. **Citação de Artigos em Geral:** Sobrenome seguido das iniciais dos seis primeiros autores. Para sete ou mais autores, liste os seis primeiros, seguidos de "et al."), título completo do artigo (no idioma original), título abreviado do periódico (pode ser encontrado Em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), ano de publicação, volume (número), páginas inicial e final abreviada.

Exemplo 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005;62(1):112-6.

Exemplo 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;50(1):115-21.

2. **Capítulo de livro:** Sobrenome seguido das iniciais dos autores do capítulo, título completo do capítulo, editores, título do livro, Edição, local de publicação: editor, ano de publicação, páginas inicial e final do capítulo abreviada.

Exemplo: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health*. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

1. **Livro:** Sobrenome seguido das iniciais dos autores do livro, título do livro, edição, local de publicação: editor, ano de publicação e número de páginas do livro.

Exemplo: Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

4. **Sites:** Nome do autor/organização. Título da página [Internet]. Local de publicação: Nome do editor; Data ou ano de publicação [atualizado ano mês dia; Citado ano mês dia]. Disponível em: endereço.

Exemplo: Diabetes Australia. *Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

5. **5. Dissertação/Tese:** A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não aceitará a citação de dissertação/mestrado, teses de doutorado ou similar.

Ilustrações: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, pela primeira vez, em ordem numérica crescente.

Título e Legendas: devem ser digitados com espaçamento duplo no final do manuscrito.

Dimensões: As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Imagens/Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato *TIFF*. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (*Adobe Photoshop, Corel Photo Paint*, etc).
- **Gráficos:** Devem ser criados usando software estatístico e devem ser salvos/exportados com a extensão original (**.xls, .xlsx, .wmf, .eps ou .pdf**).
- **Mapas:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares Corel Draw ou Illustrator* em alta resolução.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer abaixo da mesma. O significado de todas as siglas e símbolos utilizados na tabela devem constar no rodapé da tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, em ordem numérica crescente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte *Times New Roman*, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão reavaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá reenviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

1. Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.
2. Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las assim que possível.
3. Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.
4. Todos os artigos aceitos que ainda não tenham sido impressos estarão disponíveis online enquanto aguardam publicação na versão impressa (*ahead of print*).

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não indica qualquer tipo de serviços de tradução.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.